

# 五子衍宗丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘脱失及氧化应激损伤的影响

樊慧杰<sup>1</sup>, 李艳荣<sup>1</sup>, 柴智<sup>1\*</sup>, 刘建春<sup>1</sup>, 王新亮<sup>1</sup>, 茹意<sup>1</sup>, 尉杰忠<sup>2</sup>, 肖保国<sup>3</sup>, 马存根<sup>1,2\*</sup>

(1. 山西中医药大学, 国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室, 山西 晋中 030619; 2. 山西大同大学脑科学研究所, 山西 大同 037009; 3. 复旦大学华山医院神经病学研究所, 上海 200025)

**摘要:** 目的 研究方剂五子衍宗丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠的治疗作用及其在氧化应激方面的机制。方法 C57BL/6 雌鼠随机分为佐剂组、模型组和五子衍宗丸组, 模型组和五子衍宗丸组用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白35~55(MOG<sub>35-55</sub>)免疫建立小鼠EAE模型, 五子衍宗丸组于免疫后第3天给予五子衍宗丸灌胃干预, 直到免疫后第27天, 佐剂组与模型组给予等量0.9%氯化钠溶液灌胃。第28天处死小鼠, 脊髓冰冻切片进行固蓝染色及HE染色, Western blot检测脑组织SOD、CAT蛋白表达, 试剂盒检测脑组织GSH、MDA水平。结果 五子衍宗丸可减轻EAE小鼠脊髓髓鞘脱失, 减少炎性细胞浸润, 增加脑组织CAT、SOD蛋白表达和GSH水平, 降低脑组织MDA水平。结论 五子衍宗丸对EAE具有明确的治疗作用, 可减轻中枢神经系统的髓鞘脱失及炎性浸润, 其作用机制可能与抑制氧化应激损伤有关。

**关键词:** 五子衍宗丸; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 氧化应激损伤

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)12-3460-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.038

多发性硬化是一种慢性炎症性中枢神经系统脱髓鞘疾病, 常累及脊髓、脑室周围等部位的白质<sup>[1]</sup>。该病呈全球分布, 好发于青壮年, 女性发病率高于男性, 致残率高, 预后差。多发性硬化可能与遗传、免疫、感染等因素有关, 氧化应激在发病机制中扮演着重要的角色。在发病的初始阶段, 氧化应激通过上调反应性活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平, 进而破坏血脑屏障, 同时使机体的过氧化产物增多<sup>[2]</sup>, 而过多的过氧化产物比如羰基化蛋白质会使病程进一步迁延难愈<sup>[3]</sup>。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是国际公认的多发性硬化实验动物模型<sup>[4]</sup>。

五子衍宗丸是临床常用的补肾良方, 现代药理研究表明, 五子衍宗丸不仅能改善生殖功能<sup>[5]</sup>, 而且对神经系统

有良好的保护作用。五子衍宗丸的预先给药可以有效防治孕鼠胚胎的神经管畸形<sup>[6-7]</sup>。加味五子衍宗丸有促进神经细胞分化的作用, 可能是其发挥抗痴呆药理作用的潜在机制<sup>[8]</sup>。课题组前期已经证实五子衍宗丸对EAE有明确的治疗作用<sup>[9]</sup>, 在此基础上, 本研究继续采用EAE模型, 以髓鞘脱失、炎性浸润程度进一步明确五子衍宗丸的治疗作用, 并基于氧化应激角度, 探讨五子衍宗丸治疗EAE小鼠的作用机制。

## 1 材料

1.1 动物 清洁级健康8~10周龄C57BL/6雌性小鼠30只, 体质量(19±1)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006, 实验动物使用许可证号SYXK(晋)2020-0006。实验前,

**收稿日期:** 2021-04-12

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81102552, 81703978); 中央引导地方科技发展资金自由探索类基础研究项目(YDZX20201400001483); 山西省国际科技合作项目(201703D421016); 山西省青年拔尖人才支持计划项目(晋组办字[2019]35); 山西省自然科学基金项目(201901D111334); 山西省留学回国人员科技活动项目择优资助项目(20200026); 山西省卫健委医学科技领军团队(2020TD05); 山西省高等学校科技创新计划项目(2019L0724); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项”项目(2020PY-JC-03); 山西中医药大学青年科学家培育计划项目(2021PY-QN-03); 山西中医药大学学科建设项目资助(2021)

**作者简介:** 樊慧杰(1978—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中西医结合防治神经系统疾病研究。Tel: (0351) 3179702, E-mail: fanhuijie.happy@163.com

\* **通信作者:** 柴智(1979—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合防治神经系统疾病研究。Tel: (0351) 3179952, E-mail: chaizhi008@126.com

马存根(1960—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事神经免疫学研究。Tel: (0351) 3179702, E-mail: macungen@sxtcm.edu.cn

小鼠适应性饲养1周,饲养环境为清洁级,通风良好,昼夜节律自然照明,温度(22±2)℃,相对湿度45%~55%,小鼠自由饮食进水。对小鼠的处理过程符合动物伦理学标准,并已经通过学校实验动物伦理委员会审查。

1.2 药物 五子衍宗丸由北京同仁堂股份有限公司生产(批号18035041),主要药材为枸杞子、菟丝子(炒)、覆盆子、五味子(蒸)和盐车前子,辅料是赋形剂蜂蜜,呈棕褐色的水蜜丸,每100粒重10g,研磨成粉末状后过筛(0.355mm),0.9%氯化钠溶液溶解粉末配制混悬液,在4℃下贮存备用,临用前取出回温并充分混匀。

1.3 仪器 电泳仪(型号PowerPac™)、凝胶成像分析仪(型号HOOD-II)(美国Bio-Rad公司);冰冻切片机(型号CM1950,德国Leica公司)。

1.4 试剂 过氧化氢酶(catalase, CAT)一抗购自美国Cell Signaling Technology公司(批号14097);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)一抗购自美国Novus Biologicals公司(批号NB100-1992);β-肌动蛋白(β-actin)一抗购自武汉博士德有限公司(批号AA1217B68088Z);谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号20180102)及丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒(批号20180111)均购自南京建成生物工程研究所。

## 2 方法

2.1 分组与造模 小鼠按体质量随机分为佐剂组、模型组、五子衍宗丸组,每组10只,模型组和五子衍宗丸组小鼠在背部4~5脊椎两侧分4点进针,皮下注射抗原乳剂0.1mL,由含250μg髓鞘少突胶质细胞糖蛋白35~55(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG<sub>35-55</sub>)的磷酸盐缓冲液和含350μg结核分枝杆菌的完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)按1:1比例混合而成<sup>[10]</sup>;佐剂组皮下注射磷酸盐缓冲液和CFA的1:1混合乳剂,0.1mL/只。免疫注射当天记录为免疫第0天,于免疫第0、2天,模型组、五子衍宗丸组小鼠均腹腔注射免疫增强剂百日咳毒素,300ng/只,而佐剂组小鼠腹腔注射等量的0.9%氯化钠溶液。

2.2 给药 五子衍宗丸组小鼠于免疫后第3天灌胃给药,剂量为16g/kg<sup>[9]</sup>,而佐剂组、模型组小鼠均以0.9%氯化钠溶液灌胃。剂量均为50mL/kg,每天2次,间隔时间为12h,持续25d(即到免疫后第27天)。

2.3 指标检测 免疫后第28天麻醉、解剖小鼠,心脏灌注0.9%氯化钠溶液直到肝脏变白,分离脊髓并将其脱水、包埋、液氮冷冻,用于冰冻切片。同时采集每只小鼠脑组织,用于氧化应激指标检测。

2.3.1 固蓝染色 每组取5只小鼠的脊髓冰冻切片,70%乙醇中浸泡15min,57℃固蓝溶液中孵育24h,依次在95%乙醇、去离子水、0.05%碳酸锂中浸洗,70%乙醇分化,经梯度脱水、透明、封片后在显微镜下观察。

2.3.2 HE染色 每组取5只小鼠的脊髓冰冻切片,4%多聚甲醛固定10min,苏木素染色12min,0.1%盐酸乙醇分

化20s,伊红溶液染色1min,乙醇梯度脱水,二甲苯溶液透明,中性树脂封片,室温条件下避光晾干,在显微镜下观察拍照。

2.3.3 Western blot检测SOD、CAT表达 将小鼠脑组织置于含液氮的研钵中研磨成粉末,取一半加入裂解液,BCA法检测蛋白浓度,计算SDS-PAGE电泳上样体积,5%浓缩胶集中,10%分离胶分离,电泳结束后将凝胶蛋白用半干式转膜法转到PVDF膜(稳压15V、时间30min),5%脱脂奶粉封闭PVDF膜1.5h,分别加入抗SOD(1:1000)、抗CAT(1:1000)一抗,4℃孵育过夜,次日加入羊抗兔辣根过氧化物酶耦联二抗(1:10000)孵育2h,洗涤后加入ECL化学发光液,采用Bio-Rad凝胶成像分析仪检测并拍摄蛋白条带,通过Image Lab 3.0软件分析蛋白灰度值。

2.3.4 微量酶标法检测GSH水平 取“2.3.3”项下另一半小鼠研磨脑组织粉末,加入0.9%氯化钠溶液制成脑组织匀浆液,采用酶标仪检测405nm波长处吸光度,计算脑组织中GSH水平,具体步骤参照相关试剂盒说明书进行。

2.3.5 比色法检测MDA水平 取“2.3.4”项下小鼠脑组织匀浆液,采用酶标仪检测532nm波长处吸光度,计算脑组织中MDA水平,具体步骤参照相关试剂盒说明书进行。

2.4 统计学分析 通过GraphPad Prism 5.0软件进行处理,数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两两比较采用 $t$ 检验,多组间比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 五子衍宗丸抑制EAE小鼠的髓鞘脱失 图1显示,与佐剂组比较,模型组小鼠脊髓白质呈现大范围髓鞘脱失( $P<0.01$ ),表明模型制备成功;与模型组比较,五子衍宗丸组小鼠脊髓白质髓鞘脱失范围减少( $P<0.01$ )。

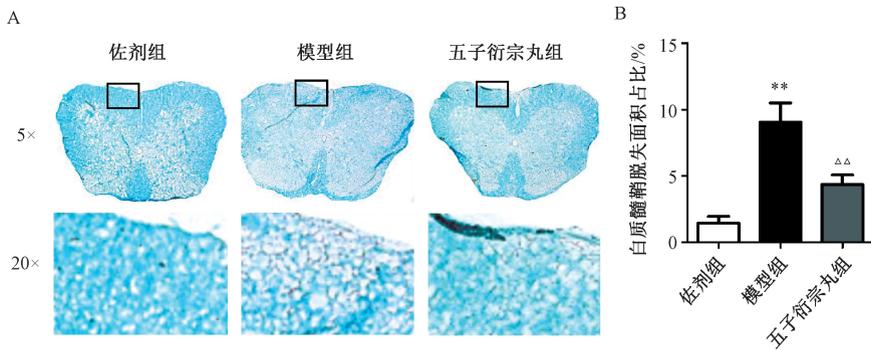
3.2 五子衍宗丸减轻EAE小鼠脊髓的炎性细胞浸润 图2显示,与佐剂组比较,模型组小鼠脊髓白质呈现大量炎性细胞浸润( $P<0.01$ );与模型组比较,五子衍宗丸组小鼠脊髓白质仅有少量炎性细胞浸润( $P<0.01$ )。

3.3 五子衍宗丸对氧化应激指标的影响 图3显示,与佐剂组比较,模型组小鼠脑组织CAT表达降低( $P<0.05$ ),SOD表达呈降低趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );与模型组比较,五子衍宗丸组小鼠脑组织CAT、SOD表达升高( $P<0.01$ )。

图4显示,与佐剂组比较,模型组小鼠脑组织GSH水平降低( $P<0.05$ ),MDA水平升高( $P<0.01$ );与模型组比较,五子衍宗丸组小鼠GSH水平升高( $P<0.01$ ),MDA水平降低( $P<0.01$ )。

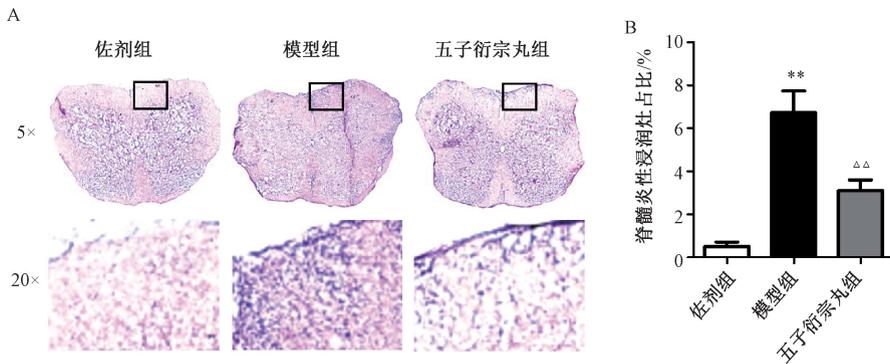
## 4 讨论

近年来,研究者们日益关注到氧化应激机制在多发性硬化发病中的重要性<sup>[11]</sup>。正常生理状态下,机体就有ROS等自由基的产生,也有抗氧化体系如CAT、SOD、GSH等发挥抗氧化的作用,氧化与抗氧化维持在一个动态平衡中。研究表明,中枢神经系统氧的需求量大以及自由基的清除



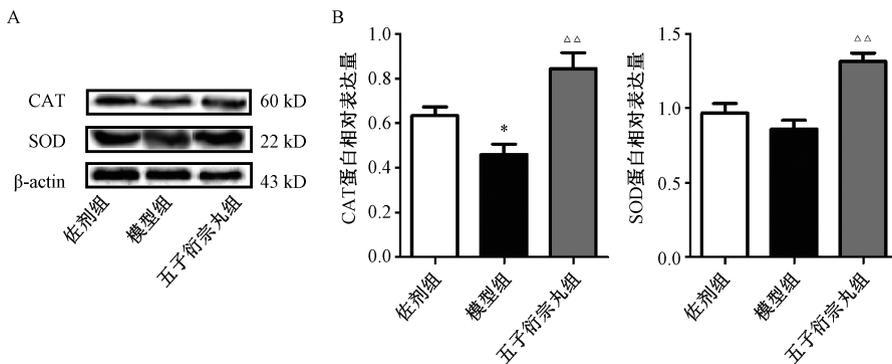
注：A 为脊髓固蓝染色，B 为脊髓白质髓鞘脱失面积占比。与佐剂组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠脊髓白质髓鞘脱失情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



注：A 为脊髓 HE 染色，B 为脊髓炎性浸润灶占比。与佐剂组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠脊髓炎性细胞浸润情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



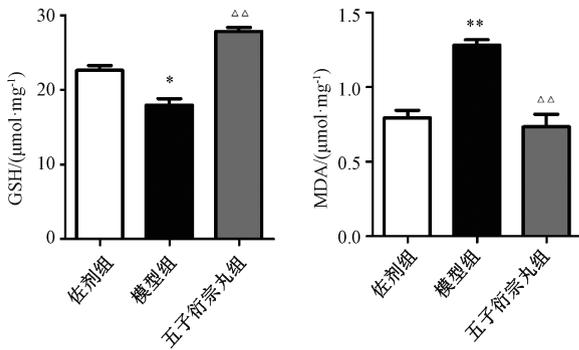
注：A 为 Western blot 蛋白条带图，B 为不同组别 CAT、SOD 蛋白表达统计图。与佐剂组比较，\*  $P < 0.05$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图3 各组小鼠脑组织 CAT、SOD 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

能力弱，所以大脑、脊髓比其它组织器官更容易受到自由基的攻击<sup>[11]</sup>；在多发性硬化病变中神经元就有大量的 ROS 产生，使氧化—抗氧化体系向氧化损伤一方倾斜<sup>[12]</sup>。脂类是中枢神经系统髓鞘的主要成分，约占髓鞘干重的 70%，氧化应激状态下，ROS 等过多的自由基攻击生物膜的不饱和脂肪酸，脂质过氧化产物增多，有研究表明大量的自由基可能是多发性硬化神经系统脱髓鞘的原因之一<sup>[13]</sup>。氧化应激引起的髓鞘受损，将加剧炎性细胞对中枢神经系统的浸润，扩大机体的炎症反应<sup>[14]</sup>。所以减轻多发性硬化的氧化应激损伤程度，是延缓其进展的热门靶点。

在国家中医药管理局制定的疾病中医治疗的方案中，将多发性硬化以“痿病”来表述<sup>[15]</sup>。关于多发性硬化病因

病机与病位的认识，虽然各中医学者的观点不统一，但是多数学者认为多发性硬化是肾虚为本，湿热浊毒为标的疾病<sup>[16-17]</sup>。“人始生，先成精，精成而脑髓生”是中医认识多发硬化的理论基础，若肾精亏损，则髓海不足。所以在多发硬化的临床中药治疗中多体现了补肾固髓的思想<sup>[17]</sup>。五子衍宗丸是至今仍在临床上广泛应用的补肾固精之良方。有研究表明，五子衍宗丸还可以改善衰老小鼠的学习、记忆能力，同时提升其免疫水平，具体机制可能与五子衍宗丸增强衰老小鼠的抗氧化能力有关<sup>[18]</sup>。五子衍宗丸及其拆方的单味中药枸杞子、菟丝子对老年大鼠脑和心脏组织线粒体 DNA 的氧化损伤均具有保护作用<sup>[19]</sup>。单味中药五味子通过提高 SOD、GSH 的水平，可以减轻氧化损



注: 与佐剂组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 各组小鼠脑组织 GSH、MDA 水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

伤, 进而维持细胞膜的稳定性<sup>[20]</sup>。在前期研究的基础上, 本研究进一步明确五子衍宗丸对 EAE 的治疗作用, 五子衍宗丸可以减轻 EAE 小鼠中枢神经系统的脱髓鞘反应, 减少炎性细胞的浸润, 具体机制可能与 SOD 及 CAT 蛋白表达的上调、GSH 水平增加、MDA 水平降低相关, 使氧化应激损伤程度减轻, 从而对 EAE 小鼠的中枢神经系统产生保护作用。

本研究将为五子衍宗丸推广到临床治疗多发性硬化提供科学思路和实验依据, 有助于开发五子衍宗丸的老药新用领域, 使五子衍宗丸拥有更为广阔的发展潜力和前景。

参考文献:

[ 1 ] Bonnier G, Roche A, Romascano D, et al. Multicontrast MRI quantification of focal inflammation and degeneration in multiple sclerosis[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 569123.

[ 2 ] Van Horsen J, Schreibelt G, Drexhage J, et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression[J]. *Free Radical Bio Med*, 2008, 45(12): 1729-1737.

[ 3 ] Dasgupta A, Zheng J, Perrone-Bizzozero N I, et al. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *ASN Neuro*, 2013, 5(1): e00111.

[ 4 ] Baker D, Amor S. Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely[J]. *Mult Scler Relat Disord*, 2014, 3(5): 555-564.

[ 5 ] 殷金龙, 徐 渊, 吴 斌. 五子衍宗丸对睾丸支持细胞氧化应激损伤和细胞凋亡的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2013, 19(3): 257-261.

[ 6 ] 樊慧杰, 柴 智, 解 军, 等. 五子衍宗丸对 ATRA 诱导

的神经管畸形防治作用初探[J]. *中成药*, 2014, 36(5): 1054-1056.

[ 7 ] 樊慧杰, 李艳彦, 王永辉, 等. 五子衍宗丸对 NTDs 胎鼠神经管细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(9): 143-146.

[ 8 ] 曾克武, 万彦军, 廖理曦, 等. 加味五子衍宗丸神经保护作用靶点群的鉴定与功能分析[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(19): 3656-3660.

[ 9 ] 张若楠, 柴 智, 樊慧杰, 等. 五子衍宗丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠防治作用及其机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1316-1319.

[ 10 ] Williams J L, Kithcart A P, Smith K M, et al. Memory cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) govern the transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 234(1-2): 84-92.

[ 11 ] Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pierzchala K, et al. Antioxidative enzymes activity and malondialdehyde concentration during mitoxantrone therapy in multiple sclerosis patients[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(6): 683-690.

[ 12 ] Lim J L, Wilhelmus M M M, De Vries H E, et al. Antioxidative defense mechanisms controlled by Nrf2: state-of-the-art and clinical perspectives in neurodegenerative diseases [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(10): 1773-1786.

[ 13 ] Gray E, Thomas T L, Betmouni S, et al. Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis[J]. *Brain Pathol*, 2008, 18(1): 86-95.

[ 14 ] Haider L, Fischer M T, Frischer J M, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions [J]. *Brain*, 2011, 134(7): 1914-1924.

[ 15 ] 国家中医药管理局医政司. 24 个专业 105 个病种中医治疗方案[M]. 北京: 国家中医药管理局医政司, 2011: 13-17.

[ 16 ] 王殿华, 陈金亮. 关于构建肾督、络脉理论假说论治脊髓病的思考[J]. *中医杂志*, 2011, 52(16): 1366-1369.

[ 17 ] 刘晓艳, 孙 怡. 补肾固髓片治疗多发硬化临床与实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(1): 10-14.

[ 18 ] 王光勇, 狄国杰, 曾 晓, 等. 五子衍宗方对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆及抗氧化损伤的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2012, 18(10): 1093-1095.

[ 19 ] 王学美, 富 宏, 刘庚信. 五子衍宗丸及其拆方对老年大鼠心脑线粒体 DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体及 ATP 合成的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(6): 437-440.

[ 20 ] Zhang M, Xu L, Yang H. *Schisandra chinensis* Fructus and its active ingredients as promising resources for the treatment of neurological diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1-25.